

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/67, 15/52, 15/70 C12N 1/21, C12P 17/18 C12N 1/21, C12R 1/19, 1/01		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/08023 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. April 1994 (14.04.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02688 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Oktober 1993 (01.10.93) (30) Prioritätsdaten: 3124/92 2. Oktober 1992 (02.10.92) CH 2134/93 15. Juli 1993 (15.07.93) CH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LONZA AG [CH/CH]; Gampel/Wallis, Münchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BIRCH, Olwen [GB/CH]; Dammweg 11D, CH-3904 Naters (CH). BRASS, Johann [DE/CH]; In den Schatmatten, CH-3938 Ausserberg (CH). FUHRMANN, Martin [DE/CH]; Litternaweg 9, CH-3930 Visp (CH). SHAW, Nicholas [GB/CH]; Weingartenweg 14, CH-3930 Visp (CH).		(74) Anwälte: WEINHOLD, Peter; Siegfriedstrasse 8, D-80803 München (DE) usw. (81) Bestimmungsstaaten: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: BIOTECHNOLOGICAL METHOD OF PRODUCING BIOTIN

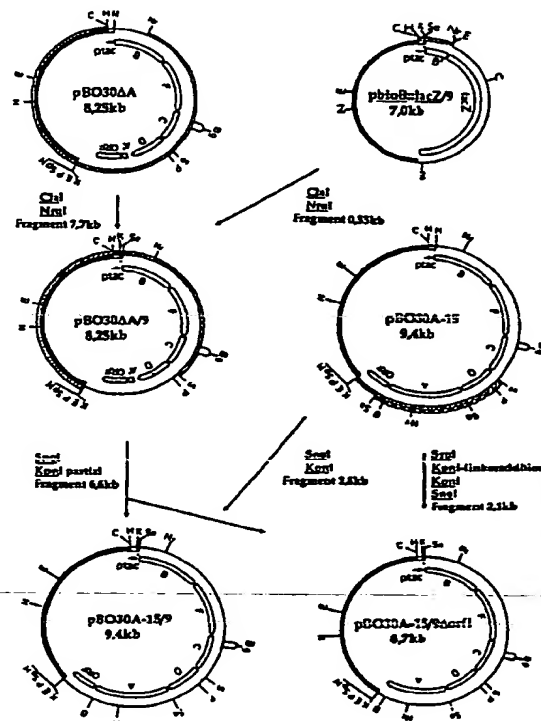
(54) Bezeichnung: BIOTECHNOLOGISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOTIN

(57) Abstract

The invention pertains to DNA fragments and plasmids comprising the *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD* and *bioA* genes responsible for biosynthesis of biotin, or their functionally equivalent genetic variants and mutants from enteric bacteria, wherein the genes are arranged in a transcription unit. The invention also pertains to microorganisms that contain these DNA fragments and plasmids and a method of producing biotin using these microorganisms.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft DNA-Fragmente und Plasmide, umfassend die Gene der Biotin-Biosynthese *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD* und *bioA* oder deren funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten aus Enterobakterien, worin die Gene in einer Transkriptionseinheit angeordnet sind. Die Erfindung betrifft ferner Mikroorganismen, die diese DNA-Fragmente und Plasmide enthalten, und ein Verfahren zur Herstellung von Biotin unter Verwendung dieser Mikroorganismen.



Ansprüche

- 5 1. DNA-Fragment umfassend die Gene der Biotin-Biosynthese bioB, bioF, bioC, bioD und bioA oder deren funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten aus Enterobakterien, worin die Gene in einer Transkriptionseinheit angeordnet sind.
- 10 2. DNA-Fragment nach Anspruch 1, worin die Enterobakterien ausgewählt sind aus der Gruppe der Gattungen Escherichia, Salmonella und Citrobacter.
- 15 3. DNA-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, worin die Enterobakterien ausgewählt sind aus der Spezies Escherichia coli.
- 20 4. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das genregulatorische Element der Transkriptionseinheit den tac-Promotor umfaßt.
- 25 5. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das genregulatorische Element, in direkter Verknüpfung mit dem bioB-Gen, die Sequenz umfaßt:
AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTTAGGAGG TGACTAGTC
- 30 6. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das genregulatorische Element, in direkter Verknüpfung mit dem bioB-Gen, die Sequenz umfaßt:
AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGG TTTACTAGTC

7. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das genregulatorische Element, in direkter Verknüpfung mit dem bioB-Gen, die Sequenz umfaßt:
AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
5 GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGA CTAGTC
8. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin der Abstand zwischen den in der Transkriptionseinheit aufeinanderfolgenden Genen bioD und bioA nicht mehr als 50bp beträgt.
10
9. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin die Gene bioD und bioA derart angeordnet sind, daß der 3'-Terminus des bioD-Gens die Ribosomenbindungsstelle für das bioA-Gen umfaßt.
15
10. Plasmid, enthaltend ein DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Plasmid pBO30A-15/9, wie hinterlegt in E. coli XL1-Blue, E. coli BM4062 oder E. coli ED8767 unter den Hinterlegungsnummern DSM 7246, DSM 7247 bzw. DSM 8554.
20
12. Plasmid pBO47, wie hinterlegt in Agrobacterium/Rhizobium sp. HK4 unter der Hinterlegungsnummer DSM 8555.
25
13. Mikroorganismus, enthaltend ein DNA-Fragment oder ein Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
14. E. coli XL1-Blue, E. coli BM4062 und E. coli ED8767, jeweils enthaltend Plasmid pBO30A-13/9, hinterlegt unter den Hinterlegungsnummern DSM 7246, DSM 7247 bzw. DSM 8554, sowie deren genetische Varianten und Mutanten.
30

15. Agrobacterium/Rhizobium sp HK4, enthaltend Plasmid pBO47, hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 8555, sowie dessen genetische Varianten und Mutanten.
- 5 16. Biotechnologisches Verfahren zur Biotinsynthese, worin eine verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle mittels eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zu Biotin fermentiert wird.
- 10 17. Verfahren zur Herstellung von Biotin, das die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin im zellfreien System mittels Biotinsynthase umfaßt, worin die Umsetzung in Gegenwart von Thiaminpyrophosphat, NADPH, S-Adenosylmethionin, Fe^{2+} -Ionen, Cystein und wenigstens einer weiteren Aminosäure aus der Gruppe Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Serin erfolgt.
- 15 18. Verfahren nach Anspruch 17, worin die Umsetzung in Gegenwart von Flavodoxin und Ferredoxin(Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase durchgeführt wird.
- 20 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 oder 18, worin die Umsetzung in Gegenwart einer Proteinfraction durchgeführt wird, die erhältlich ist durch Ammoniumsulfat-Präzipitation, bei 45%-iger Sättigung, eines Zellextrakts von Escherichia coli.
- 25 20. Proteinfraction mit Biotinsynthase-stimulierender Wirkung, erhältlich durch Ammoniumsulfat-Präzipitation, bei 45%-iger Sättigung, eines Zellextrakts von Escherichia coli.
- 30 21. Verwendung einer Proteinfraction gemäß Anspruch 20 in einem Verfahren zur Herstellung von Biotin im zellfreien System.
- 35

22. Verwendung von Flavodoxin und Ferredoxin(Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase in einem Verfahren zur Herstellung von Biotin im zellfreien System.
- 5 23. Verwendung von Thiaminpyrophosphat und/oder NADPH und/oder S-Adenosylmethionin und/oder Fe²⁺-Ionen und/oder Cystein und/oder wenigstens einer weiteren Aminosäure aus der Gruppe Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Serin, einzeln oder in Kombination, in einem Verfahren zur Herstellung von Biotin im zellfreien System.
- 10